

10/525108

18 FEB 2005

PCT/JP 03/11846

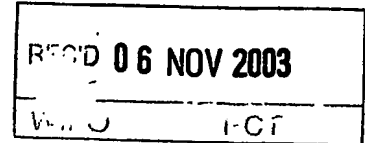
日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

17.09.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 9 月 1 8 日
Date of Application:



出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 2 7 1 9 7 3
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 7 1 9 7 3]

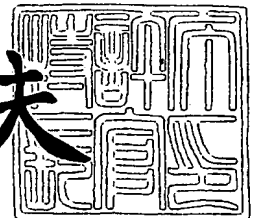
出 願 人
Applicant(s): 中嶋 光敏
 小田 竜也
 杉浦 慎治
 小山 有

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 0 月 2 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 8 7 4 5 7

【書類名】 特許願

【整理番号】 SHOKU02-01

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成14年 9月18日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 B01J 13/06

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目17番11

 【氏名】 中嶋 光敏

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県柏市根都470丁目58番 新日鐵アパート1-
304

 【氏名】 小田 竜也

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市二の宮1-10-10 サンハイツ石見
A-106

 【氏名】 杉浦 慎治

【特許出願人】

 【識別番号】 500477687

 【氏名又は名称】 中嶋 光敏

【特許出願人】

 【住所又は居所】 千葉県柏市根都470丁目58番 新日鐵アパート1-
304

 【氏名又は名称】 小田 竜也

【特許出願人】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市二の宮1-10-10 サンハイツ石見
A-106

 【氏名又は名称】 杉浦 慎治

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都杉並区久我山 4 - 1 1 - 3

【氏名又は名称】 小山 有

【代理人】

【識別番号】 100085257

【弁理士】

【氏名又は名称】 小山 有

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 038807

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 マイクロカプセルの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 高分子電解質溶液を均一な粒径の分散相として含むエマルションを調製し、このエマルションの解乳化と同時に前記高分子電解質溶液とは逆の電荷を持つ高分子電解質溶液または多価イオン溶液と接触せしめ、高分子電解質反応により分散相を構成していた微小な高分子電解質溶液の周囲に電解質複合体からなるゲル層を形成することを特徴とするマイクロカプセルの製造方法。

【請求項 2】 請求項 1 に記載のマイクロカプセルの製造方法において、前記エマルションの調製は、貫通孔を形成したプレートを通じて分散相と連続相を分離し、分散相に対し連続相にかかる圧力よりも大きな圧力をかけることで分散相を連続相中に前記貫通孔を介してマイクロスフィアとして押し出すことで調製することを特徴とするマイクロカプセルの製造方法。

【請求項 3】 請求項 1 または請求項 2 に記載のマイクロカプセルの製造方法において、前記解乳化は、エマルションに連続相を構成する物質と同一物質若しくは連続相に可溶化する物質を添加して界面活性剤の濃度を低下せしめることで起こさせることを特徴とするマイクロカプセルの製造方法。

【請求項 4】 請求項 1 または請求項 2 に記載のマイクロカプセルの製造方法において、前記エマルションを構成する連続相には界面活性剤を添加せず、解乳化しやすい状態のエマルションを調製し、このエマルションを直ちに分散相を構成する高分子電解質溶液とは逆の電荷を持つ高分子電解質溶液または多価イオン溶液と接触せしめることを特徴とするマイクロカプセルの製造方法。

【請求項 5】 請求項 1 乃至請求項 4 に記載のマイクロカプセルの製造方法において、前記エマルションを構成する分散相は、アルギン酸、カルボキシメチルセルロース、ペクチン、カラギーナン、硫酸セルロース、コンドロイチン硫酸の何れかであり、前記エマルションを構成する分散相と反応する高分子電解質は、ポリアミノ酸、第一級アミン基、第二級アミン基、第三級アミン基またはピリジニル窒素を含むポリマー、またはアミノ化多糖類の何れかであり、前記エマルションを構成する分散相と反応する多価イオンは Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+}

、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} または Mn^{2+} の何れかであることを特徴とするマイクロカプセルの製造方法。

【請求項6】 請求項1乃至請求項5に記載のマイクロカプセルの製造方法において、前記エマルションを構成する分散相となる高分子電解質溶液中には、予め所定の物質を生産する細胞を添加しておくことを特徴とするマイクロカプセルの製造方法。

【請求項7】 請求項1乃至請求項6に記載のマイクロカプセルの製造方法において、前記エマルションを構成する分散相の粒径を $50\mu\text{m}$ ～ $300\mu\text{m}$ としたことを特徴とするマイクロカプセルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DDS（ドラッグデリバリーシステム）、食品工業或いは化粧品製造等に利用されるマイクロカプセルの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

生体内に移植するカプセルとして、1～2個の細胞（ランゲルハンス島）を $500\sim 800\mu\text{m}$ のマイクロカプセルに封入したものが知られている。（文献「蛋白質、核酸、酵素Vol.45 No.13（2000）」）。

このカプセルは外側のヒドロゲルが生態の免疫機構からの攻撃（拒絶反応）に対するバリヤとして機能し、内部のランゲルハンス島が体内で長期に亘ってインスリンを分泌するのを可能とするものである。

【0003】

このようなカプセルについての最初の提案は既に、米国特許第4352883号（1979）になされている。この先行技術には、アルギン酸カルシウムゲルに細胞を固定化することが記載されている。

またこの他にも、免疫機構からの攻撃に耐える殻内に細胞を固定化して体内に移植する技術として、特表平10-500889号公報、特開平11-130698号公報或いは特表2002-507473号公報などが提案されている。

特表平10-500889号公報には、外殻がアルギン酸とスペルミンとの反応性生物で、内部が水性コアとなったマイクロカプセル内に、ロタウィルスを封入した内容が開示されている。

特開平11-130698号公報には、アルギン酸水溶液(W)を脂肪酸エステル(O)に乳化分散させてW/Oエマルションを作製し、このエマルションに多価金属(Ca^{2+} や Ba^{2+})を加えてアルギン酸多価金属塩(ゲル)からなる粒径 $0.01 \sim 5 \mu\text{m}$ の1次粒子を作り、この1次粒子の集合体に難溶性薬剤を担持せしめる内容が開示されている。

特表2002-507473号公報には、アルギン酸水溶液の微粒子を噴霧によって作製し、この噴霧によって作製したアルギン酸水溶液の微粒子をフィルム状に流下する Ca^{2+} 水溶液に衝突させることで、 $100 \sim 400 \mu\text{m}$ のマイクロカプセルが開示されている。

また特表平9-500132号公報には、経口デリバリのためのヒドロゲルマイクロカプセル化ワクチンとして、 $15 \mu\text{m}$ 以下のものが提案されている。

【0004】

上述したマイクロカプセルの外殻(ゲル)は、高分子電解質反応を利用して形成されている。具体的には「Biotechnology Progress 13 562-568 1997」に開示されるようにノズルを用いて、アルギン酸溶液などのポリアニオン溶液をポリカチオン溶液に滴下するのが一般的である。

【0005】

また、カプセルの径を小さくするために二重ノズルを用いる方法が、「AIChE J」、40、1026-1031 1994」に提案されている。この方法は内側ノズルから高分子電解質溶液を流し、外側のノズルから空気を流すことで、 $2 \text{ mm} \sim 200 \mu\text{m}$ 程度のカプセルを調製している。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

上述した従来の方法によれば、 $0.01 \mu\text{m}$ から数百 μm の範囲のマイクロカプセルを得ることができる。しかしながら、従来法によると粒径の分布が広く、均一な粒径のマイクロカプセルを得ることが困難である。

【0007】

例えば、特表平10-500889号公報や特表2002-507473号公報にあっては、アルギン酸溶液を空中に噴霧することで微細な粒子とし、これをCa²⁺水溶液に接触せしめるようにしているが、均一な粒径のカプセルを得ることができない。

【0008】

また、特開平11-130698号公報に開示されるように、従来方法でW/Oエマルションとし、これをCa²⁺水溶液等に接触せしめる場合には、W/Oエマルションを構成する分散相の液滴径を所定の範囲に揃えることが難しく、極めて細かな粒子を作成することはできるが、内部を水溶液とし、外殻をゲルとした二重構造のカプセルを作製できない。

【0009】

上述した文献は、細胞を固定したマイクロカプセルを体内に移植し、体内において「ミクロの薬品工場」として機能せしめることを示唆するものである。そして、細胞固定化マイクロカプセルが「ミクロの薬品工場」として機能するには、単にインスリンや抗がん剤などの有効物質を分泌するだけでなく、長期に亘ってカプセル内で生存することが必要になる。

【0010】

長期に亘ってカプセル内で細胞が生存するには、マイクロカプセルの粒径が重要なファクターになる。

即ち、細胞固定用のマイクロカプセルにあっては、外殻（ゲル）は免疫機構からの攻撃に耐えるだけでなく、細胞からの分泌物を外部に放出し且つ外部から細胞が生存するための栄養を取り入れ、更にはカプセル内で生じた老廃物を外部に排出する必要がある。

そして、マイクロカプセルの中心部までの距離が150 μ m（直径300 μ m）を超えると、中心部に固定されている細胞まで栄養分が届かず、また中心部の細胞の老廃物を排出できず、細胞が死滅してしまうことを本発明者らは知見した。また、マイクロカプセルの径が小さいと内部に細胞を固定化することができない。

したがって、細胞固定用のマイクロカプセルについては、極めて限られた粒径範囲内に殆んどマイクロカプセルが収まっていなければならない

【0011】

このように、細胞固定化用のマイクロカプセルについては、粒径分布が50～300 μm と狭いことが重要であるが、滴下などの従来法によるとこの範囲のマイクロカプセルを製造できるが、均一な粒径のマイクロカプセルを製造することができない。また従来単に攪拌によって得られたエマルションを用いる場合も均一で一定粒径のマイクロカプセルを製造することができない。

また、均一な粒径のマイクロカプセルは、食品や化粧品の分野においても要求されている。

【0012】

【課題を解決するための手段】

上記問題を解決するため、本発明に係るマイクロカプセルの製造方法は、先ず高分子電解質溶液を分散相に含むエマルションを調製し、次いで、このエマルションの解乳化と同時に前記高分子電解質溶液とは逆の電荷を持つ高分子電解質溶液または多価イオン溶液と接触せしめ、高分子電解質反応により分散相を構成していた微小な高分子電解質溶液の周囲に電解質複合体からなるゲル層を形成するようにした。

【0013】

本発明にあつては、高分子電解質溶液を逆の電荷を持つ高分子電解質溶液または多価イオン溶液に直接接触させずに、一旦均一な粒径の分散相を含むエマルションとし、このエマルションを逆の電荷を持つ高分子電解質溶液または多価イオン溶液に接触せしめるようにしたので、エマルションを構成する分散相とほぼ等しい径のマイクロカプセルが得られる。

【0014】

均一な径のマイクロカプセルを得るには分散相が均一な径のエマルションを得ることが必要である。このためには、貫通孔を形成したプレートを介して分散相と連続相を分離し、分散相に対し連続相にかかる圧力よりも大きな圧力をかけることで分散相を連続相中にマイクロスフィアとして押し出す手段をとることが

好ましい。

【0015】

また、効率よく分散相と逆の電荷を持つ高分子電解質溶液または多価イオン溶液とを接触せしめるには、解乳化させることが必要である。解乳化の手段としては2つ考えられる。1つはエマルションの状態を維持するため通常は界面活性剤を連続相に添加しているので、連続相を構成する物質（例えばヘキサン）と同一の物質若しくは連続相に可溶化する物質を添加して界面活性剤の濃度を低下せしめる方法で、他の1つは、エマルションの調製の際にはじめから界面活性剤を添加しない方法である。後者の場合はエマルションが短時間のうちに解乳化するため、直ちに逆の電荷を持つ高分子電解質溶液または多価イオン溶液とを接触せしめる。

【0016】

また、前記エマルションを構成する分散相としては、アルギン酸、カルボキシメチルセルロース、ペクチン、カラギーナン、硫酸セルロース、コンドロイチン硫酸などが挙げられ、前記エマルションを構成する分散相と反応する高分子電解質は、ポリアミノ酸（例えば、ポリヒスチジン、ポリリジン、ポリオルニチンなど）、第一級アミン基、第二級アミン基、第三級アミン基またはピリジニル窒素を含むポリマー（例えば、ポリエチレンイミン、ポリアリルイミン、ポリエーテルアミン、ポリビニルピリジン）またはアミノ化多糖類（例えばキトサン）などが挙げられ、前記エマルションを構成する分散相と反応する多価イオンは Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、または Mn^{2+} などが挙げられる。

【0017】

【発明の実施の形態】

以下に本発明の実施の形態を添付図面に基づいて説明する。図1（a）乃至（c）は、本発明に係るマイクロカプセルの製造方法のうち、エマルションの調製工程を説明した図、図2（a）および（b）は、本発明に係るマイクロカプセルの製造方法のうち、マイクロカプセルの製造工程を説明した図、図3は本発明方法によって得られたマイクロカプセルの拡大断面図である。

【0018】

先ず図1 (a) に示すように、多数の細孔を形成したプレートによって仕切られる一方の室に高分子電解質溶液を分散相として供給し、他方の室に連続相（ヘキサン）を供給する。

【0019】

次いで、一方の室の高分子電解質溶液に圧力を加える。すると、(b) に示すように、高分子電解質溶液が分散相となって連続相中に進入し、(c) に示すエマルションが調製される。

【0020】

ここで、進入した分散相は球状をなす。尚、連続相中に進入する球状分散相の径は細孔の大きさに依存し、細孔の寸法が等しい場合には全て等しい径の球状分散相が得られる。細孔は集積回路を作製する際に利用するプラズマエッチングにて形成され、その開口部の形状を非円形とすることで、より均質な球状分散相が得られる。

【0021】

以上の操作により、エマルションが調製されたならば、図2 (a) に示すように、分散相とは逆電荷の高分子電解質溶液または多価イオン溶液の上に、前記エマルションを相分離した状態で同一容器内に入れ、エマルションに解乳化を起こさせる。

【0022】

解乳化は連続相と同一物質（ヘキサン）若しくは連続相に可溶化する物質（大豆油、トリオレイン、オクタンなど）をエマルションに添加することで連続相中の界面活性剤の濃度を低下せしめるか、はじめから連続相に界面活性剤を添加しないようにする。

【0023】

以上の如くして、解乳化が起こると、エマルションを構成していた分散相と、この分散相とは逆電荷の高分子電解質溶液または多価イオン溶液とが接触して反応を起こし、球状分散相の周囲にゲルが形成され、図3 に示すように、外側が不溶性のゲルで、内部が細胞などを添加した高分子電解質溶液となった二重構造の

カプセルが得られる。

【0024】

次に、具体的な実施例を説明する。先ず、図4は以下の（実施例1）および（実施例2）に用いたエマルション調製装置の断面図であり、調製装置は、環状をなすケース1内に複数のプレート2、3、4およびスペーサを組み付けて構成される。11は分散相が流れる液密な第1流路、12は連続相とエマルションが流れる液密な第2流路で、これら第1流路11と第2流路12は中間のプレート3に形成した細孔（マイクロチャネル）にて連通している。また、P1は分散相供給ポンプ、P2は連続相供給ポンプ、P3はエマルション取り出しポンプ、13は透明窓、14はCCDカメラである。

【0025】

（実施例1）

カプセルの原料として、キトサン（キミカ（株）製）とカルボキシメチルセルロースナトリウム（日本理化学薬品（株）製）を用いた。また、エマルションの連続相成分としてヘキサン、界面活性剤としてTGCR-310（阪本薬品工業（株）製）を用いた。

先ず、0.8wt%カルボキシメチルセルロースを調製し、これを分散相として第1流路11にポンプP1を用いて供給し、中間プレート3の細孔を介して第2流路12内の連続相（ヘキサン）に押出し、単分散W/Oエマルションを調整した。図5はこのW/Oエマルションを拡大して示す顕微鏡写真である。

【0026】

そして、上記のエマルションと0.5wt%キトサン溶液（溶媒：酢酸）を相分離した状態で同一の容器内に存在させ、エマルションの部分にヘキサンを加えていった。

ヘキサンを加えることによって、界面活性剤濃度低下による解乳化が起こり、瞬時に分散相のカルボキシメチルセルロースとキトサン溶液が接触し、高分子電解質複合体ゲルがカルボキシメチルセルロース液滴の周りに形成され、これによりキトサン/カルボキシメチルセルロースマイクロカプセルが得られた。

【0027】

以上の如く、プレート（隔壁）に形成した細孔（マイクロチャネル）を用いることで、粒子径が約 $50\text{ }\mu\text{m}$ の極めて単分散なエマルションが調製できた。またそのエマルションを材料として作製したカプセルもほぼ同一の粒径で、極めて単分散であった。

また、作製されたマイクロカプセルをプレパラートに採取して顕微鏡観察を行ったところ、図6に示すように、無数のゲル繊維でカプセル表面膜が形成されている様子が観察された。

【0028】

（実施例2）

カプセルの原料には、アルギン酸（キミカ（株）製）を用いた。油相には大豆油を用いた。反応液には塩化カルシウム溶液 0.1 M 水溶液を用いた。

1. 5%アルギン酸水溶液（分散相）を、図4に示した装置の第1流路11に、界面活性剤を添加していない大豆油（連続相）を第2流路12に供給し、細孔（マイクロチャネル）を介して大豆油中に1.5%アルギン酸水溶液を押し出し、エマルションを調製した。

【0029】

上記のエマルションを塩化カルシウム水溶液（多価イオン）と接触させた。その結果、アルギン酸カルシウムカプセルを得た。

【0030】

実施例2によれば、図7に示すように、分散相（液滴径）が約 $80\text{ }\mu\text{m}$ の均質なエマルションを調製できた。そしてこれを塩化カルシウム水溶液中に接触（滴下）することで、図8に示すように、粒径が約 $100\text{ }\mu\text{m}$ のカプセルを得ることができた。

【0031】

【発明の効果】

以上に説明したように、本発明によれば、内部を高分子電解質溶液とし、外側をこの高分子電解質溶液と他の電解質溶液との反応によって形成されるゲルとした二重構造のカプセルを、粒径分布を揃えた状態で安定して大量に生産することができる。

したがって、食品、化粧品の分野のみならず、細胞固定用などの医療分野においても有効なカプセルを得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

(a) 乃至 (c) は、本発明に係るマイクロカプセルの製造方法のうち、エマルションの調製工程を説明した図。

【図 2】

(a) および (b) は、本発明に係るマイクロカプセルの製造方法のうち、マイクロカプセルの製造工程を説明した図。

【図 3】

本発明方法によって得られたマイクロカプセルの拡大断面図

【図 4】

(実施例 1) および (実施例 2) に用いたエマルションの調製装置の断面図

【図 5】

(実施例 1) のエマルションの調製状態を示す顕微鏡写真

【図 6】

(実施例 1) によって得られたマイクロカプセルの顕微鏡写真

【図 7】

(実施例 2) のエマルションの調製状態を示す顕微鏡写真

【図 8】

(実施例 2) によって得られたマイクロカプセルの顕微鏡写真

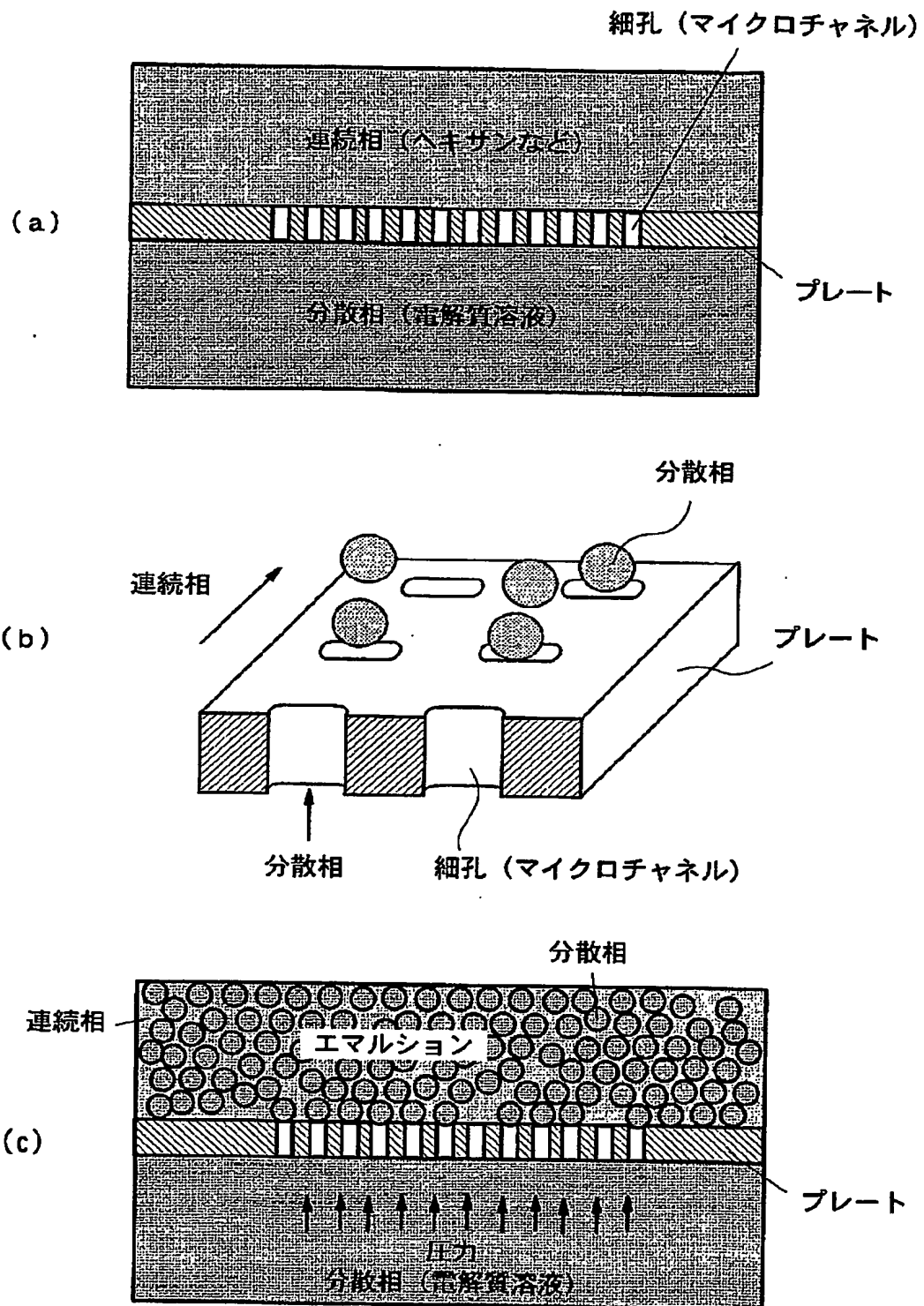
【符号の説明】

1…ケース、2, 3, 4…プレート、11…第1流路、12…第2流路、13…窓、14…CCDカメラ、P1…分散相供給ポンプ、P2…連続相供給ポンプ、P3…エマルション取り出しポンプ。

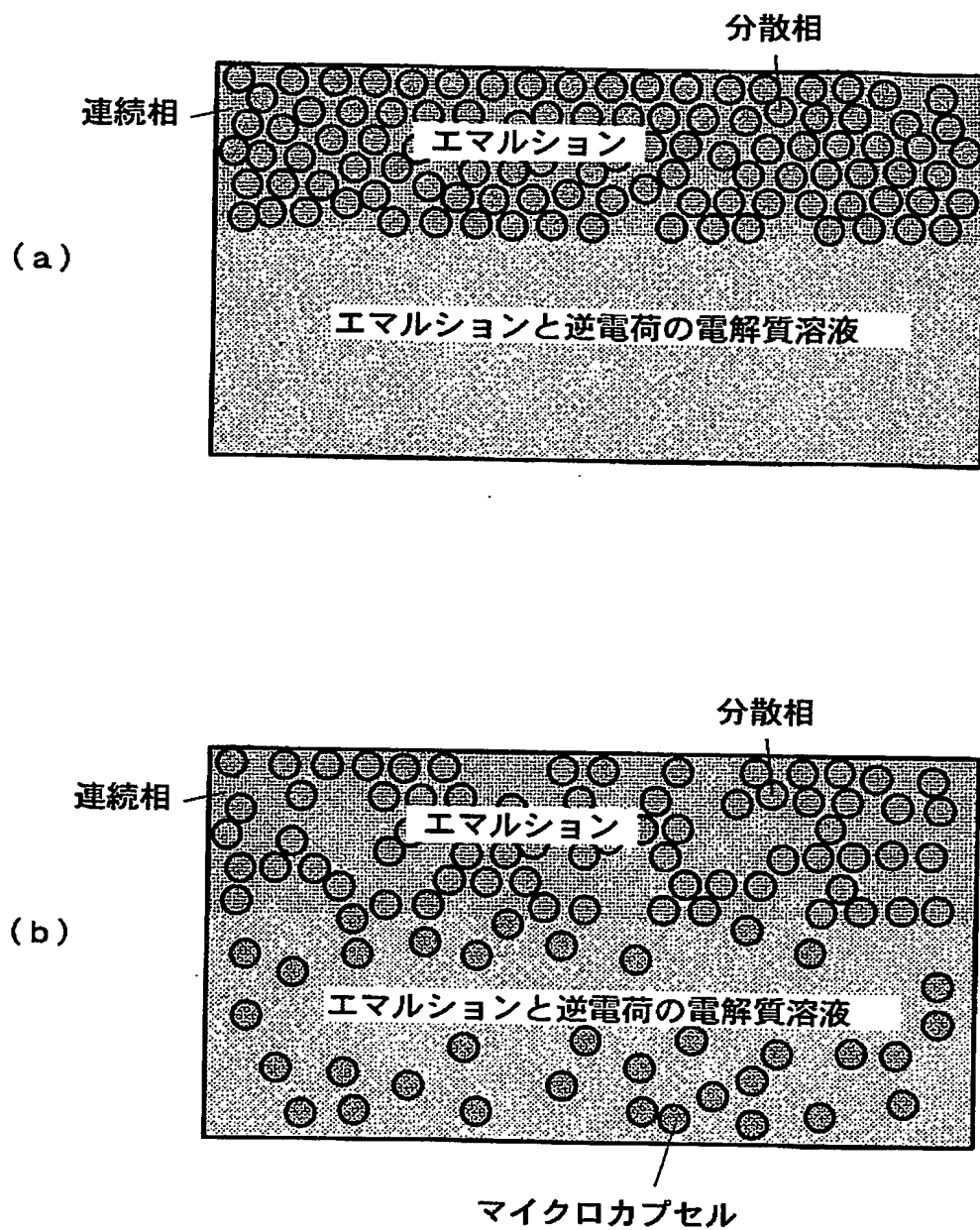
【書類名】

図面

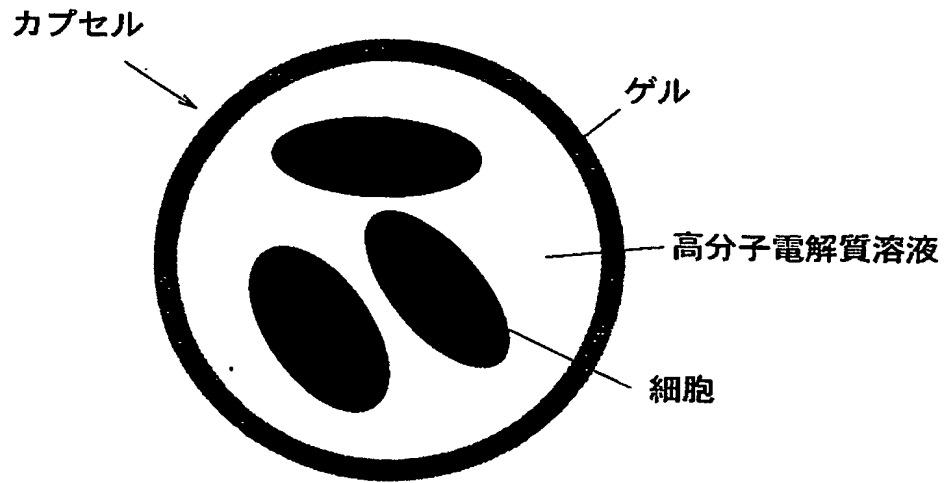
【図 1】



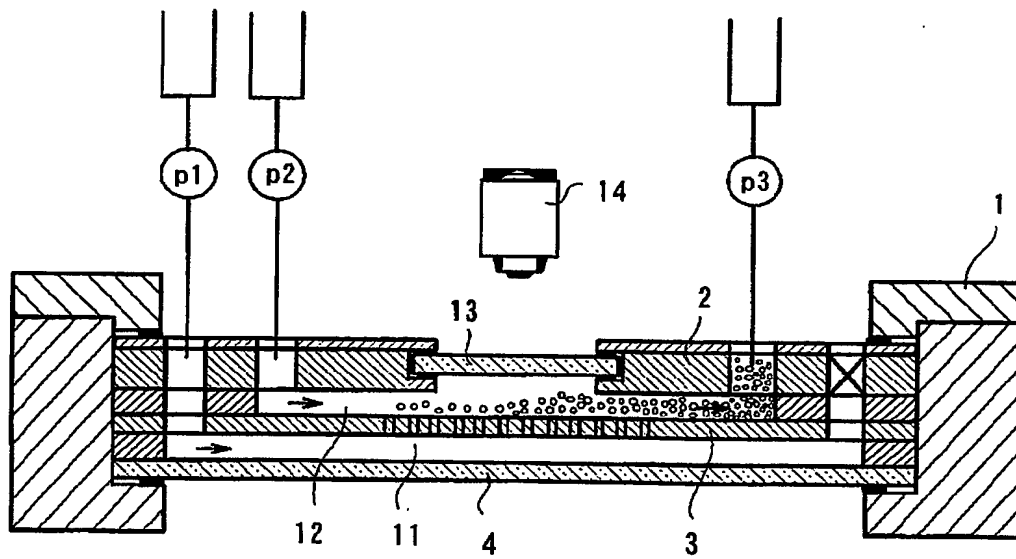
【図 2】



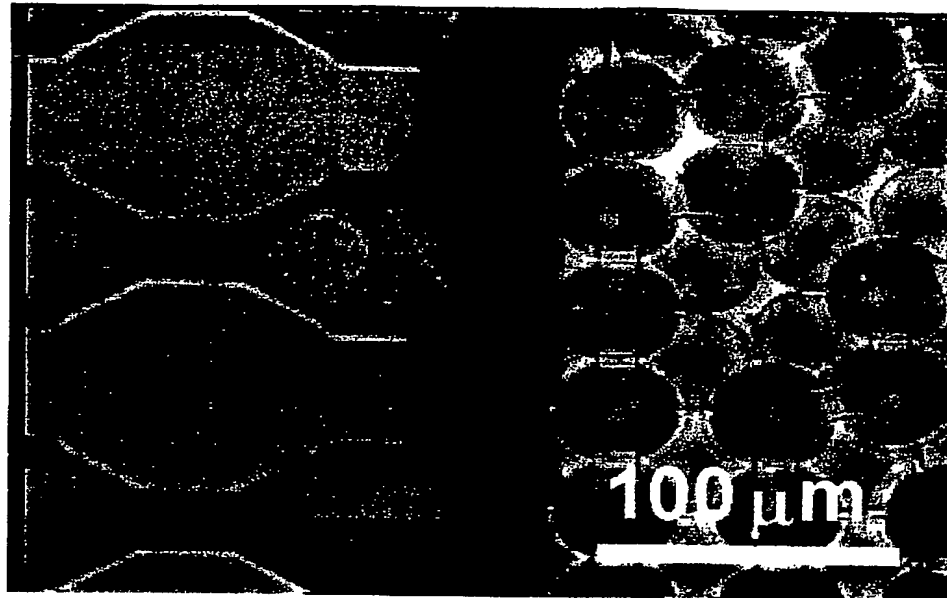
【図 3】



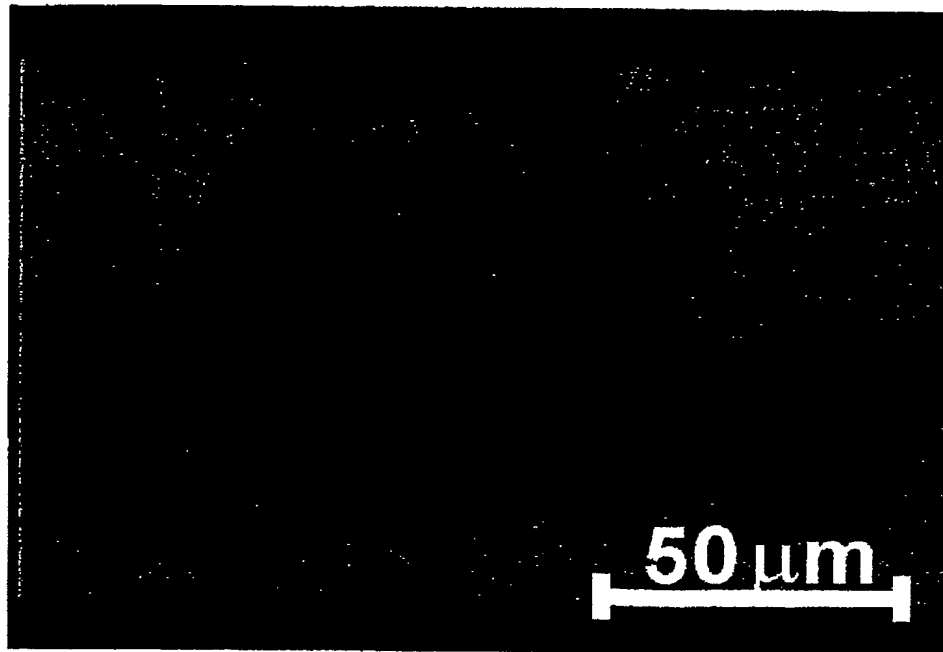
【図 4】



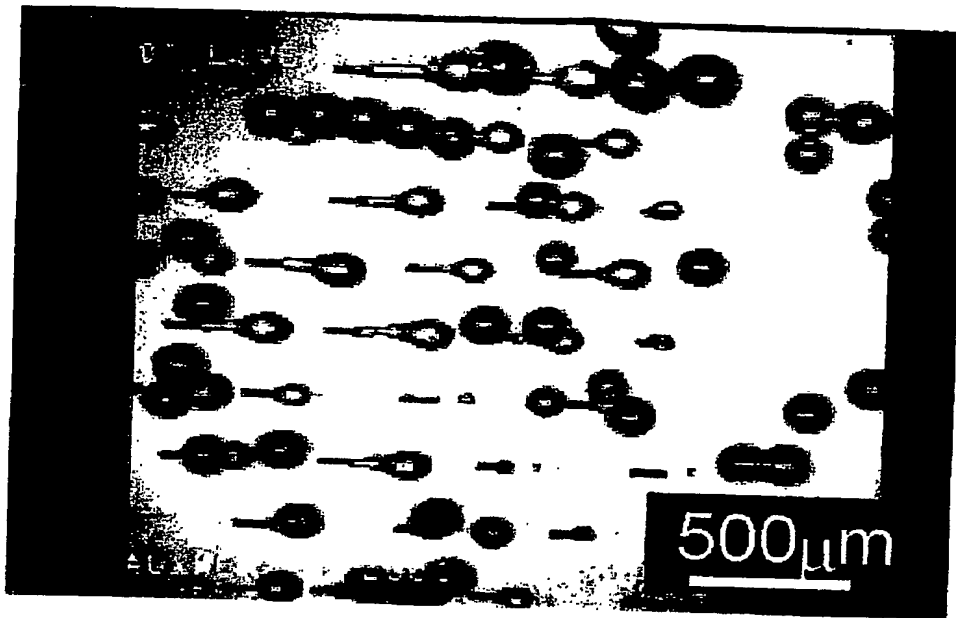
【図 5】



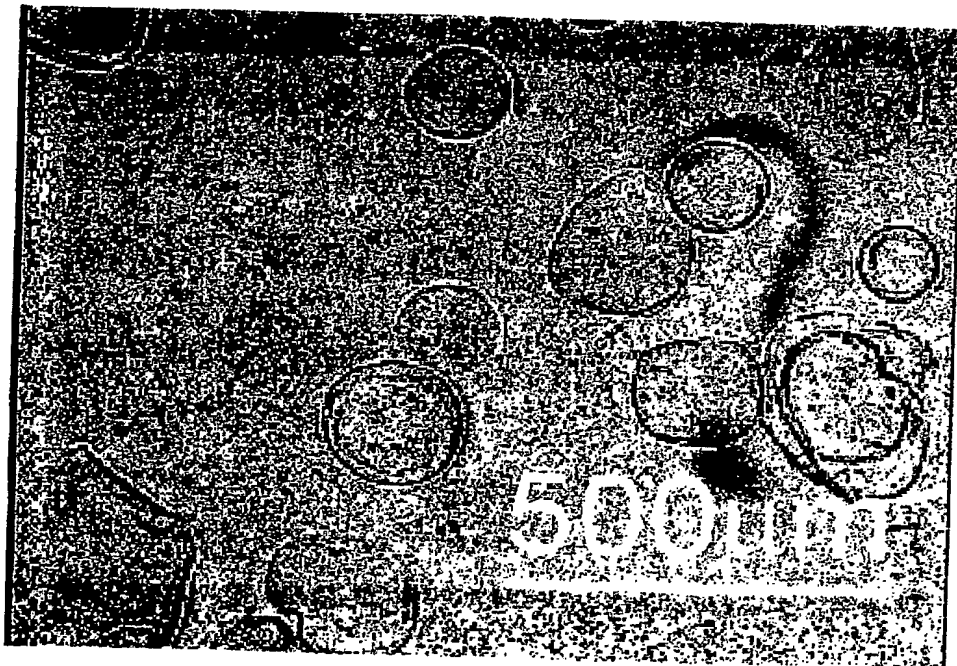
【図 6】



【図7】



【図8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 粒径が均一なマイクロカプセルを大量に製造できる方法を提供する。

【解決手段】 多数の細孔（マイクロチャネル）を形成したプレートによって仕切られる一方の室に高分子電解質溶液を分散相として供給し、他方の室に連続相を供給し、分散相に圧力をかけてエマルションを調製し、このエマルションを解乳化し、分散相を分散相とは逆電荷の高分子電解質溶液または多価イオン溶液と接触せしめ、高分子電解質反応により球状分散相の周囲にゲルを形成し、外側が不溶性のゲルで、内部が細胞などを添加した高分子電解質溶液となった二重構造のカプセルを得る。

【選択図】 図 2

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-271973
受付番号	50201397569
書類名	特許願
担当官	鎌田 柁規 8045
作成日	平成14年11月20日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	500477687
【住所又は居所】	茨城県つくば市観音台1-17-11
【氏名又は名称】	中嶋 光敏

【特許出願人】

【識別番号】	502340011
【住所又は居所】	千葉県柏市根都470丁目58番 新日鐵アパート1-304
【氏名又は名称】	小田 竜也

【特許出願人】

【識別番号】	502340022
【住所又は居所】	茨城県つくば市二の宮1-10-10 サンハイ ツ石見A-106
【氏名又は名称】	杉浦 慎治

【特許出願人】

【識別番号】	502340734
【住所又は居所】	東京都杉並区久我山4-11-3
【氏名又は名称】	小山 有

【代理人】

申請人	
【識別番号】	100085257
【住所又は居所】	東京都千代田区麴町5丁目7番地 秀和紀尾井町 TBRビル922号
【氏名又は名称】	小山 有

次頁無

特願 2002-271973

出願人履歴情報

識別番号

[500477687]

1. 変更年月日

2000年10月13日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市観音台1-17-11

氏 名

中嶋 光敏

特願 2002-271973

出願人履歴情報

識別番号

[502340011]

1. 変更年月日

2002年 9月18日

[変更理由]

新規登録

住 所

千葉県柏市根都470丁目58番 新日鐵アパート1-304

氏 名

小田 竜也

特願 2002-271973

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502340022]

1. 変更年月日

2002年 9月18日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市二の宮1-10-10 サンハイツ石見A-1
06

氏 名

杉浦 慎治

特願 2002-271973

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502340734]

1. 変更年月日

2002年 9月18日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都杉並区久我山4-11-3

氏 名

小山 有